

اثر هیپراکسی نورموباریک متناوب و فعالیت پروتئین کیناز C بر نفوذپذیری سد خونی - مغزی در رت

فیروزه علویان^۱، دکتر سهراب حاجی زاده^{۱*}، دکتر محمدرضا بیگدلی^۲، دکتر محمد جوان^۱

^۱گروه فیزیولوژی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، ^۲گروه زیست شناسی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۱۶ اصلاح نهایی: ۹۰/۱۱/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۱۶

چکیده:

زمینه و هدف: اخیراً نشان داده شده هیپراکسی نورموباریک متناوب اثر درمانی قابل ملاحظه ای در درمان ایسکمی حاد دارد. در مطالعه حاضر اثر هیپراکسی نورموباریک متناوب و فعالیت پروتئین کیناز C در نفوذپذیری سد خونی - مغزی، همچنین ارزیابی رفتاری در رت بررسی شده است. روش بررسی: در این مطالعه تجربی ۳۶ رت نژاد ویستار به ۶ گروه شش تایی شامل: نورموکسی (شم)، نورموکسی + Chelerythrin chloride (CHEL)، نورموکسی + سکنه، نورموکسی + سکنه + CHEL، هیپراکسی + سکنه و هیپراکسی + سکنه + CHEL تقسیم شدند. از CHEL مهارگر سیستمیک پروتئین کیناز C، به منظور بررسی اثر پروتئین کیناز C استفاده شد، در گروه های هیپراکسی، اکسیژن خالص با غلظت ۹۵٪ و گروه های نورموکسی اکسیژن ۲۱٪ به مدت ۲۴ ساعت و ۶ روز پیوسته فراهم شد. ۲۴ ساعت بعد رت های گروه سکنه به مدت ۶۰ دقیقه تحت انسداد شریان کاروتید اصلی راست قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت از جریان خون مجدد، نفوذپذیری سد خونی - مغزی و نقایص رفتاری مورد بررسی قرار گرفت. داده ها به کمک آزمون های آماری آنالیز واریانس دو راهه و Bonferroni تجزیه و تحلیل شد. یافته ها: پیش شرطی سازی با هیپراکسی نورموباریک نقص های نورولوژیک و نفوذپذیری سد خونی - مغزی را کاهش داد. با مهار پروتئین کیناز C، نقص های نورولوژیک افزایش یافت که با به کارگیری هیپراکسی، کاهش معنی داری داشت ($P < 0/001$). مهار پروتئین کیناز C بدون ارتباط با هیپراکسی باعث بهبود عملکرد سد خونی - مغزی شد ($P < 0/001$). نتیجه گیری: با به کارگیری هیپراکسی و زیرواحدهای ویژه ای از پروتئین کیناز C، استحکام سد خونی - مغزی بیشتر شده و امتیاز نقص های رفتاری در جریان سکنه بهبود می یابد.

واژه های کلیدی: سکنه، پیش شرطی سازی، هیپراکسی، پروتئین کیناز C، کلرترین کلراید.

مقدمه:

می شود. پیش شرطی سازی پدیده ای درون زاد است که مسئول افزایش تحمل بافت مغزی در برابر آسیب های بعد از سکنه مغزی است که طی آن نوروں ها از اثرات زیان آور ایسکمی مغزی که در طی و پس از سکنه ایجاد می شود، محافظت می شوند (۲)، طی پیش شرطی سازی، اعمال دوره های کوتاه ایسکمی و جریان مجدد قبل از القاء یک دوره ایسکمی طولانی

یکی از مهم ترین عوامل ناتوانی و مرگ ایسکمی مغزی است (۱)، تحریکات آسیب رسان در دوزهای پایین و زیر آستانه آسیب رسان باعث القاء پاسخ های سازشی است که مغز را در برابر استرس های بعدی حاصل از همین تحریکات آسیب رسان (تحمل) و دیگر تحریکات آسیب رسان (تحمل متقابل) حفاظت می کند، این پدیده اصطلاحاً پیش شرطی سازی نامیده

*نویسنده مسئول: تهران- دانشگاه تربیت مدرس- دانشکده پزشکی- گروه فیزیولوژی پزشکی- تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۸۴۵۲۱

TNF α در بافت مغز باشد (۱۱).

یکی از تظاهرات بالینی آسیب دستگاه عصبی مرکزی پس از ایسکمی مغزی، شکل گیری ادم مغزی ناشی از شکسته شدن سد خونی - مغزی است. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، ادم مغزی بعد از انواع آسیب ها را کاهش می دهد (۱۲). این امر بیان می کند که اکسیژن رادیکالی نقش مهمی در شکستن سد خونی - مغزی ایفاء می نماید. روشن شدن پاسخ این سوال که هیپراکسی نورموباریک چگونه و با چه مکانیسم هایی قادر به ایجاد تحمل به ایسکمی است، می تواند منشاء اطلاعات فیزیولوژیکی و کاربردی مفیدی باشد.

فعال شدن پروتئین کیناز C (PKC) ممکن است به عنوان محرک فاکتورهای نسخه برداری عمومی در قلب و مغز عمل نماید، که می تواند شروع کننده مسیرهای سیگنالی متفاوت القاء کننده تحمل به ایسکمی باشد (۱۳). توزیع ناهمگن PKC در نواحی ویژه مغز بیانگر فعالیت های خاص آن می باشد (۱۴). PKC نوعی هیستون پروتئین کیناز است که به وسیله فسفولیپیدها، دی آسپیل گلیسرول و کلسیم فعال می شود. نتیجه فعالیت این دسته از آنزیم ها شامل بسیاری وقایع سلولی و فیزیولوژی نظیر افزایش رهایی انتقال دهنده های عصبی، غیر حساس شدن رسپتورها و تعدیل کانال های یونی می باشد (۱۵). به نظر می رسد که تقریباً هر نوع استرس زیر کشنده، سلول ها را در برابر استرس های کشنده، مقاوم و صاحب تحمل به ایسکمی سازد. به طوری که افزایش های متعاقب کلسیم سیتوزولی، حاصل فعال سازی گیرنده NMDA حین پیش شرطی سازی است. این افزایش یون کلسیم ممکن است روند پیام رسانی آبخاری را پیش برد. این امر بیان می کند که مسیر حفاظتی عصبی ممکن است فعال سازی القائی PKC را درگیر سازد (۱۶). شواهد قوی مبنی بر درگیری PKC در القای تحمل با پیش شرطی سازی در قلب وجود دارد، به طوری که افزایش گذرای کلسیم در قلب، دی آسپیل گلیسرول را فعال می کند که

مدت، سبب کاهش عوارض ناشی از ایسکمی و جریان مجدد بعدی است. پیش شرطی سازی به ایسکمی ممکن است اجزای عصبی، میو کاردی، عروقی را درگیر سازد که فرایندهای متعدد سلولی را جامعیت می دهد تا در نهایت منجر به کاهش مصرف انرژی و آسیب ناشی از خون رسانی مجدد شود. پیش شرطی سازی پدیده ای دو مرحله ای است که دارای مرحله اولیه و ثانویه است: مرحله اولیه کوتاه مدت و مستقل از سنتز پروتئین است، در حالی که مرحله ثانویه بلند مدت است و با تغییر بیان ژن بروز می کند (۳). عوامل متعددی مانند: هیپوکسی (۴)، ایسکمی (۲)، رسپتورهای ان متیل دی آسپاراتات (NMDA) (۵) و استرس اکسیداتیو (۶) فرایند تحمل مغز در برابر ایسکمی را القاء می کنند. یکی از روش های موثر برای افزایش مقاومت بافت ها در برابر ایسکمی، استفاده از روش هیپراکسی نورموباریک می باشد. این روش آثار سمی و جانبی روش های قبلی را ندارد، هزینه پائینی داشته و قابلیت پیاده سازی بالینی را دارد (۷). هیپراکسی ارائه اکسیژن افزایش یافته اتمسفری است (۸). پیش شرطی سازی با هیپراکسی نورموباریک، القاگر حفاظت عصبی در مغز از طریق شکل گیری رادیکال های آزاد اکسیژن می باشد (۹). در تحقیقی نشان داده شد که هیپراکسی نورموباریک، جریان خون مغز و اکسیژن رسانی را بهبود می بخشد (۱۰). همچنین Bigdeli و همکاران نشان دادند که هیپراکسی نورموباریک باعث القاء افزایش تحمل بافت مغزی است (۷). القای این مقاومت از طریق تنظیم افزایشی ناقلین گلوتامات مغز و سطوح TNF α سرم صورت می گیرد که نتیجه آن کاهش حجم سخته، امتیازهای نقایص نورولوژیک، ادم مغزی و نفوذپذیری سد خونی - مغزی است. هیپراکسی با افزایش استحکام سد خونی - مغزی، با تاثیر روی محتوی و هموستازی آب مغز، تنظیم کننده حجم سلولی نورون ها و آستروسیت ها به طور مستقیم است، که این وضعیت می تواند به واسطه تولید گونه های آزاد اکسیژن و

روش بررسی:

این مطالعه از نوع تجربی بوده و از موش های نر نژاد ویستار (۲۵۰ تا ۳۵۰ گرم) استفاده شد. نمونه گیری و گروه بندی به طور تصادفی صورت گرفت. رت ها با سیکل روشنایی - تاریکی ۱۲ ساعته، دمای حدود ۲۵ درجه سانتی گراد و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. کلیه اصول اخلاقی مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفت. محل انجام آزمایش ها، در دانشگاه تربیت مدرس تهران بود.

با توجه به نظر متخصص آماری و منابع مشابه و هدف مطالعه در هر گروه ۶ رت مورد آزمایش قرار گرفتند، حیوانات در ۶ گروه، که شامل: نورموباریک نورموکسی (شم)، نورموباریک نورموکسی سخته، نورموباریک نورموکسی سخته + CHEL، هیپراکسی نورموباریک سخته + CHEL، ۶ رت، داخل قفس بزرگ و با آب و غذای کافی در جعبه ای به ابعاد ۲۰۰×۳۵۰×۴۵۰ mm، از جنس شیشه محکم، با مجرای برای عبور شلنگ متصل به کپسول اکسیژن قرار می گرفتند. در گروه های هیپراکسی، اکسیژن خالص با غلظت ۹۵ درصد (به مدت ۶ روز پیوسته، هر روز ۴ ساعت) فراهم شد. غلظت اکسیژن به وسیله حسگر حساس به اکسیژن (Lutron-Do5510 oxygen sensor, Taiwan) مداوم کنترل می شد. برای افزایش دقت آزمایش، یک الکتروود سنجش اکسیژن نیز در کنار جعبه تعبیه می شد تا غلظت اکسیژن داخل جعبه را اندازه گیری کند (Do5510 oxygen sensor, Taiwan - Lutron). سودالیم (BDH Limited, Poole, England) که نوعی جاذب CO2 است در گوشه های جعبه قرار گرفت بدین ترتیب، امکان تغییر غلظت گاز داخل جعبه به حداقل می رسید. گروه های نورموکسی به همین شکل در جعبه قرار می گرفتند با این تفاوت که در معرض

به دنبال آن انواع زیرگروه هایی PKC فعال شده و سپس فسفوریلاسیون چندین پروتئین غشایی در گیر در حفاظت عصبی رخ می دهد (۱۷).

PKC یکی از مهمترین عوامل تنظیم کننده اتصالات محکم سد خونی - مغزی می باشد. این فاکتور به واسطه اثر بر روی بخش هایی مانند مولکول های چسباننده ماتریکس، اتصالات سلول - سلول و سیتواسکلت، ساختار سد خونی - مغزی را متاثر می سازد، به طوری که ثابت شده PKC موجب فسفوریلاسیون پروتئین occluding اتصالات محکم (۱۸)، اکتین اسکلت سلولی و مولکول های چسباننده ماتریکس بین سلولی شده، که نتیجه آن افزایش نفوذپذیری پاراسلولار اندوتلیال و به هم خوردن اتصالات محکم است (۱۸).

همچنین ثابت شده فعالیت زیر واحدهایی از PKC در پاسخ به گونه های آزاد اکسیژن افزایش می یابد (۱۴)، به طوری که در یک آزمایش، وقتی سلول ها در معرض اکسیژن ۹۵ درصد قرار گرفتند، افزایش ۲ برابر در فعالیت زیر واحدهایی از PKC مشاهده شد (۱۳).

به هر حال نقش PKC در القای تحمل به ایسکمی به واسطه هیپراکسی هنوز به خوبی شناخته نشده و فعال شدن PKC تحت اثر اکسیدان ها مشوق ما در تحقیق نقش PKC در مدل سخته مغزی و شرایط هیپراکسی، بر نفوذپذیری سد خونی - مغزی و ارزیابی رفتاری می باشد. لذا این پژوهش با هدف روشن تر کردن برخی آثار مهم و فیزیولوژیکی هیپراکسی نورموباریک بر مغز انجام شده و می تواند به صورت بالقوه اطلاعات کاربردی بالینی جالب توجهی را به همراه داشته باشد. اطلاعات حاصل از این پژوهش می تواند بستری فراهم کند تا برای جلوگیری از بروز سخته مغزی به آثار پیش شرطی سازی، گرایش به وجود آید.

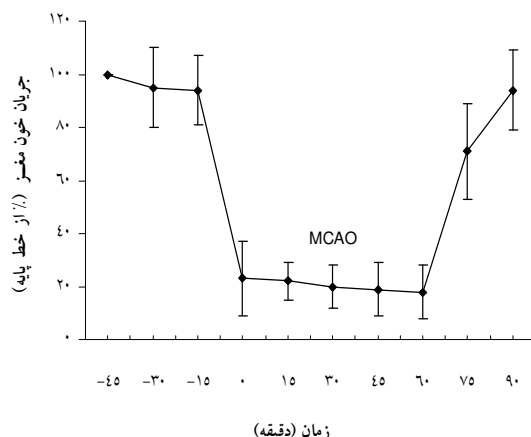
اکسیژن ۲۱ درصد هوای اتاق قرار داشتند. پس از خارج کردن از جعبه، رت ها به مدت ۲۴ ساعت در شرایط آزمایشگاه نگهداری شدند (۱۹،۷).

جهت ایجاد مدل سکته مغزی، ۲۴ ساعت پس از خارج کردن رت ها از جعبه، حیوانات وزن شده و به وسیله کلرال هیدرات (۴۰۰ mg/kg) (Merck, Germany) و به شکل داخل صفاقی بیهوش شدند. سپس به کمک میکروسکوپ جراحی، شکافی در خط میانی گردن ایجاد شد، تا شاخه راست کاروتید و شاخه اکسترنال آن نمایان شود. شاخه راست کاروتید و شاخه اکسترنال با دقت از عصب واگ و بافت های مجاور جدا شد، پایه کاروتید راست و شاخه اکسترنال را با نخ بخیه محکم بسته، سپس شاخه اینترنال و سرخرگ پتریگو پالاتین با کلمپ بسیار ظریف موقت مسدود شد. سوراخ کوچکی در کاروتید راست ایجاد نموده و نخ نایلون ۳-۰ را با دقت حدود ۲۲-۲۰ میلی متر از آن عبور داده تا حدی که سر نخ نایلونی، ابتدای سرخرگ سری جلویی را لمس کند و مقاومت ملایم حس شود (۲۰،۷). در طول جراحی درجه حرارت رکتال کنترل می شد (Citizen-513w) و حدود ۳۷ درجه سانتی گراد به وسیله گرم کردن و یا خنک کردن سطحی ثابت می ماند. ریت تنفسی - قلبی و غلظت گازها در رنج فیزیولوژیک کنترل می شد. جریان خون مغز نیز پیوسته با دستگاه لیزر داپلر (LDF; Moor Instrument, UK)، برای اطمینان از ایجاد مدل سکته (در ایجاد ایسکمی موفق بیش از ۲۵٪ کاهش جریان خون از خط پایه لازم است) کنترل شد. جریان خون مجدد با خارج کردن نخ نایلونی، بعد از ۱ ساعت برقرار شد (۷). سپس محل باز شده گردن، بخیه شده و حیوانات به داخل قفس های مجزا منتقل می شدند. گروه های شم در همان شرایط گروه سکته به جز عدم عبور نخ نایلونی تیمار شدند.

معاینه های نورولوژیک بعد از ۲۴ ساعت از جریان مجدد خون انجام شد. در طول ۲۴ ساعت بعد از شروع انسداد تا قربانی شدن حیوان مراقبت های ویژه

انجام می گرفت. یافته های نورولوژیک در ۵ مقیاس دسته بندی شدند (۲۰): شماره صفر (۰): هیچ گونه عارضه نورولوژیک نشان نمی دهد، شماره یک: نارسایی کامل در انتهای پنجه های جلویی، (که یک نقص نورولوژیک کانونی خفیف در نظر گرفته شده). شماره دو: به چپ چرخیدن (نقص نورولوژیک کانونی متوسط)، شماره ۳: افتادن سمت چپ (نقص کانونی شدید)، رت های شماره ۴ به طور خود بخودی نمی توانند راه روند و سطح هوشیاری پایین دارند و رت هایی که طی ۲۴ ساعت بعد جراحی می میرند در صورتی که بعد از رنگ آمیزی بخش وسیعی از مغزشان آسیب دیده باشد و مرگ منحصر به سکته مغزی باشد، به آنها شماره ۵ داده می شد.

استحکام سد خونی - مغزی توسط اندازه گیری میزان خروج اوانس بلو (EB) ارزیابی می شد. نخست، رت ها از طریق ورید دم محلول اوانس بلوی ۲ درصد را به اندازه ۴ میلی لیتر در کیلوگرم وزن بدن بعد از ۳۰ دقیقه ایسکمی دریافت کردند. ۲۴ ساعت بعد از جریان مجدد خون، رت ها تحت بی هوشی، از ناحیه قفسه سینه باز شدند و با ۲۵۰ میلی لیتر سالین از طریق بطن چپ از وجود اوانس بلو داخل رگی پاک شدند تا زمانی که مایع پرفیوز بی رنگ از دهلیز راست خارج شود. سپس، مغز حیوان خارج می شد. سپس نواحی کرتکس و مرکز مغز با دقت مجزا می شدند. برای اندازه گیری میزان خروج EB، بافت مغز در ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات هموژن شده و برای رسوب پروتئین به آن ۲/۵ میلی لیتر اسید تری کلرواستیک ۶۰ درصد اضافه شد. سپس ۳ دقیقه با ورتکس به هم زده شد و ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد خنک شد. آنگاه به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت، جذب نوری اوانس بلو در بخش رویی توسط اسپکتوفتومتر (Genova, Jenway) در جذب ۶۱۰ نانو متر اندازه گیری شد و مطابق منحنی استاندارد غلظت آن محاسبه گردید (۲۱،۷).



نمودار شماره ۲: تغییرات جریان خون مغزی قبل، حین و بعد از ایسکمی. مدل سکتۀ Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO)

جیوه) از فشار اکسیژن شریانی در شرایط نورموکسی بود ($92/8 \pm 1/65$ میلی متر جیوه) ($P < 0/001$). در بررسی تغییرات جریان خون شریان مرکزی، جریان خون مغزی حین ایسکمی به زیر ۲۵ درصد خط پایه و طبیعی کاهش یافت (نمودار شماره ۲).

در مدل (Middle Cerebral Artery Occlusion) MCAO، میانگین امتیاز نقص نورولوژیک، با به کار بردن هیپراکسی، به طور قابل ملاحظه ای کاهش یافت. مهار PKC به وسیله CHEL باعث افزایش میانگین امتیاز نقص نورولوژیک، در گروه های نورموکسی و هیپراکسی شد، که این افزایش در گروه های نورموکسی که CHEL دریافت کرده بودند به طور معنی داری نسبت به سایر گروه ها بیشتر بود ($P < 0/05$) (جدول شماره ۱).

در رت هایی که به واسطه قرار گرفتن در معرض MCAO هیچ گونه نقص نورولوژیک مشاهده نشده بود، با تزریق ایوانس بلو (EB)، این رنگ در ناحیه مرکزی سکتۀ مشاهده شد. این مدرک نشان داد که در کلیه رت های مذکور انسداد شریان مرکزی مغز صورت گرفته بود، ولی به دلیل پدیده تحمل به ایسکمی، به ویژه در ناحیه قشر مغز، استحکام سد خونی - مغزی افزایش یافته بود.

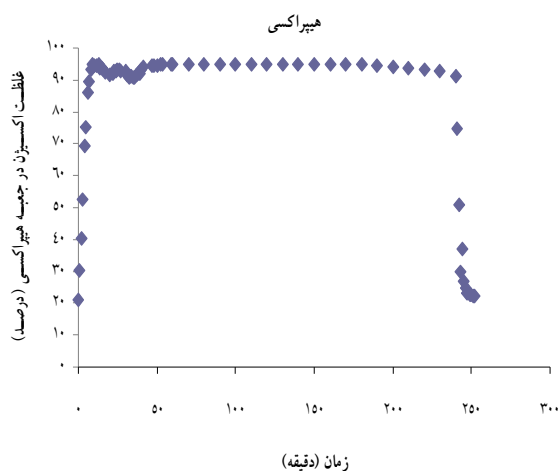
Chelerythrin Chloride (CHEL) به عنوان

مهارگر اختصاصی PKC انتخاب و از شرکت سیگما خریداری شد. دوز مصرفی، ۱ mg/kg و به شکل زیر پوستی به مدت ۶ روز، حدود ۲۰ دقیقه قبل از قرار دادن حیوانات در جعبه مخصوص تزریق شد.

پارامترهای فیزیولوژیکی با استفاده از آزمون آنالیز واریانس دو راهه و آزمون متعاقب Bonferroni مورد آنالیز قرار گرفت. امتیازهای نقص نورولوژیک با استفاده از آزمون کروسکال والیس و آزمون تعقیبی دان مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای بررسی توزیع مشاهدات از آزمون کولموگراف اسمیرنوف استفاده شد. تمام آنالیزها با کمک نرم افزار Graph Pad Prism انجام شد. $P < 0/05$ از لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها:

محتوای اکسیژن (%) داخل جعبه اکسیژن در شرایط نورموکسی (۲۱٪) و هیپراکسی نورموباریک (۹۵٪) بود (نمودار شماره ۱). بر اساس ارزیابی های آزمایش گازهای خونی شریانی، فشار اکسیژن شریانی گروه هیپراکسی بسیار بالاتر ($352/1 \pm 8/8$ میلی متر



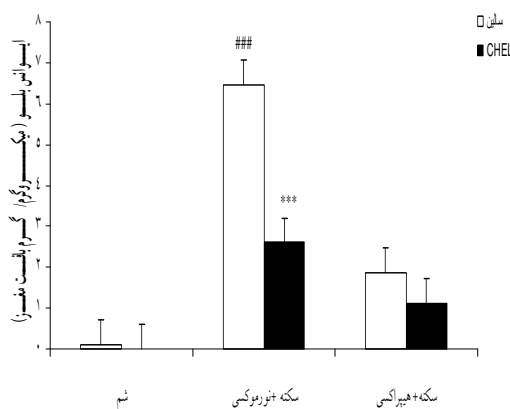
نمودار شماره ۱: تغییرات غلظت اکسیژن در گروه هیپراکسی در واحد زمان

جدول شماره ۱: اثر هیپراکسی و CHEL بر نقایص نورولوژیک در گروه های سکنه

گروه	تعداد نقص های نورولوژیک هر گروه					تعداد کل	میان
	۰	۱	۲	۳	۴		
سکنه	۱۰	۴	۴	۵	۱	۲۴	۲/۱۲
*سکنه + هیپراکسی	۱۰	۸	۶	۰	۰	۲۴	۰/۸۳
**سکنه + CHEL	۰	۱	۵	۹	۹	۲۴	۳/۰۸
†سکنه + هیپراکسی + CHEL	۴	۵	۸	۲	۵	۲۴	۱/۹۵
کل	۲۴	۱۸	۲۳	۱۶	۱۵	۹۶	-

* $P < 0.001$ نسبت به گروه سکنه و سکنه + CHEL $P = 0.002$ نسبت به گروه سکنه + هیپراکسی + CHEL
 ** $P < 0.001$ نسبت به گروه سکنه و $P = 0.003$ نسبت به گروه سکنه + هیپراکسی + CHEL † $P > 0.05$ نسبت به گروه سکنه
 - امکان محاسبه وجود ندارد.

CHEL = Chelerythin Chloride (1mg/kg)



نمودار شماره ۴: نفوذپذیری سد خونی - مغزی در ناحیه مرکز گروه های مورد آزمایش

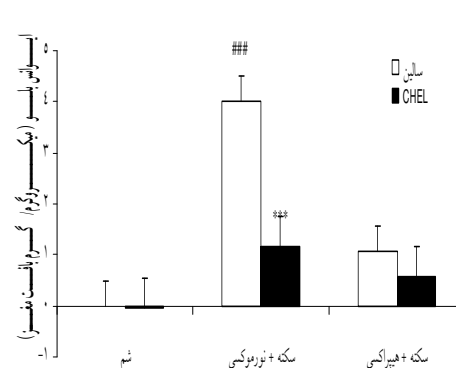
*** $P < 0.001$ نسبت به گروه نورموکسی - سکنه +

سالین و هیپراکسی - سکنه + CHEL

$P < 0.001$ نسبت به گروه شام. شام: نورموکسی

CHEL = Chelerythin Chloride (1mg/kg)

نورموکسی - سکنه، نفوذپذیری سد خونی - مغزی و خروج ایوانس بلو به طور معنی داری در هر دو ناحیه کاهش یافت ($P < 0.001$). در گروه های هیپراکسی - سکنه و هیپراکسی - سکنه + CHEL، در مقایسه با گروه نورموکسی - سکنه، میزان نفوذپذیری سد خونی - مغزی و خروج ایوانس بلو در هر دو ناحیه به طور معنی دار کاهش یافت ($P < 0.001$) (نمودارهای شماره



نمودار شماره ۳: نفوذپذیری سد خونی - مغزی در ناحیه کرتکس گروه های مورد آزمایش

*** $P < 0.001$ نسبت به گروه نورموکسی - سکنه +

سالین و هیپراکسی - سکنه + CHEL

$P < 0.001$ نسبت به گروه شام. شام: نورموکسی

CHEL = Chelerythin Chloride (1mg/kg)

تشکیل ادم مغزی در گروه های نورموکسی - سکنه در هر دو ناحیه کرتکس و مرکز، با افزایش نفوذپذیری سد خونی - مغزی در ۲۴ ساعت مرتبط بود. در هر دو ناحیه مغز، گروه های نورموکسی - سکنه در مقایسه با گروه های شام افزایش معنی داری در خروج ایوانس بلو داشتند. در گروه نورموکسی - سکنه که CHEL دریافت نموده بودند در مقایسه با گروه

۳ و ۴). در گروه های انسداد شریان مرکزی مغز، ایوانس بلو عموماً در ناحیه مرکزی دیده می شد.

بحث:

بر اساس نتایج به دست آمده از این مطالعه، در گروه های سخته، هر دو ناحیه کرتکس و نواحی مرکزی مغز میزان نفوذپذیری سد خونی - مغزی در مقایسه با گروه های کنترل به طور معنی داری افزایش یافت. این یافته با مطالعات قبلی انجام شده در این زمینه مطابق است (۲۱، ۷). سد خونی - مغزی به واسطه اتصالات محکم اندوتلیال عروق شکل گرفته، تغییرات التهابی نوروها می توانند سبب تخریب این سد و در نتیجه مرگ سلولی شوند (۲۲). مطالعات نشان داده که شکسته شدن سد خونی - مغزی می تواند نتیجه فعال شدن متالوپروتئینازهای ماتریکس که خانواده ای از اندوپیتیدازها هستند باشد. سوبسترای اختصاصی این آنزیم ها پروتئین های موجود در ماتریکس خارج سلولی اندوتلیالی مانند فیبرونکتین، لامینین و کلاژن هستند. سلول های اندوتلیالی، گلیاها، پرستیها و نوروها می توانند اشکال غیر فعال این آنزیم ها را بیان کنند (۲۳) که این اشکال غیر فعال توسط فرآیندهایی چون التهاب به فرم فعال تبدیل می شوند. نشان داده شده که متالوپروتئینازهای ماتریکس می توانند سبب مهاجرت نوتروفیل ها به بافت و در نتیجه ایجاد چرخه معیوب برای افزایش التهاب شوند (۲۴). مطالعات همچنین اثر متالوپروتئینازهای ماتریکس بر تخریب پروتئین های مسئول ایجاد اتصالات محکم، از جمله اکلودین و کلودین طی ایسکمی را نشان داده است (۲۵). آزمایش های ما در حمایت از کارهای قبلی نشان داد که پیش شرطی سازی با هیپراکسی نورموباریک می تواند باعث کاهش امتیاز نقص نورولوژیکی و بهبود عملکرد سد خونی - مغزی شود (۷). اگرچه نتایج این تحقیق نشان می دهد که هیپراکسی در مغز رت به واسطه کاهش میزان نفوذپذیری سد خونی - مغزی و

بهبود نقص نورولوژیکی، حفاظت عصبی القاء می کند، اما هیپراکسی آثار دیگری نیز دارد که می تواند به واسطه آنها تحمل به ایسکمی را در مغز رت تقویت نماید. این آثار عبارتند از: هیپراکسی می تواند باعث رگ زایی و افزایش تراکم عروق در واحد حجم شود (۲۶). هیپراکسی می تواند باعث مهار تجمع نوتروفیل ها شود و از آسیب مغزی بکاهد (۲۷). Wada و همکارانش نشان دادند که گونه های آزاد اکسیژن و Bcl-2 که به عنوان مهار کننده آپوپتوز عمل می کنند، بعد از قرار گرفتن مکرر در معرض هیپراکسی افزایش می یابند و باعث افزایش توان زیستی نورونی می شوند (۲۸). از طرف دیگر، افزایش رادیکال های آزاد اکسیژن و سوپراکسید دیسموتاز با کاهش بیان فاکتور القائی HIF1 α ارتباط دارد که گفته می شود عملکرد سد خونی - مغزی را از طریق کاهش HIF1 α عروقی بهبود می بخشد (۲۹).

مهار PKC به طور معنی داری موجب کاهش نفوذپذیری سد خونی - مغزی هر دو ناحیه مغز، در گروه های سخته شد. این در حالی است که مهار PKC تقریباً اثری معادل با هیپراکسی داشت. PKC، نوعی سرین - ترئونین کیناز است که نقش مهمی در تعدیل نفوذپذیری سد خونی - مغزی و تنظیم اتصالات محکم دارد. PKC ۱۱ ایزوزیم دارد. ایزوفورم های PKC آنزیم های همولوگ، با اعمال ویژه می باشند که موقعیت Subcellular دارند، که تعدادی از آنها برای فعال شدن نیاز به کلسیم دارند (BI, BII, α , γ). اما λ , ζ , θ , δ , η , ϵ , μ مستقل از کلسیم عمل می کنند. کلسیم در روند آبشاری فسفوریلاسیون پروتئین هایی نظیر اکتین و پروتئین های در گیر در ساختار سد خونی - مغزی، واسطه بوده و به موجب فسفوریلاسیون، انسجام سد خونی - مغزی را کاهش می دهند. در زمان ایسکمی BI, BII, α فعال شده و نفوذپذیری سد کاهش میابد اما با هیپراکسی زیر واحدهای λ , θ , ζ , δ , η , ϵ , μ فعالند (۳۰). اگر چه در پژوهش حاضر با مهار PKC، از

فعالیت زیر واحدهای وابسته به کلسیم جلوگیری شد که نتیجه آن بهبود عملکرد سد خونی - مغزی بود اما اثر هیپراکسی در گروه های دریافت کننده مهار با گروه هایی که سالین دریافت کردند تفاوت معنی داری نداشت، که بیانگر این مطلب است که هیپراکسی و PKC از مسیرهایی متفاوت در بهبود عملکرد سد خونی - مغزی نقش دارند و این احتمال وجود دارد که هیپراکسی از طریق مسیرهایی خاص منجر به فعال شدن زیر واحدهایی از PKC شده که مستقل از کلسیم عمل می کنند.

همچنین امتیاز نقص نورولوژیکی در گروه های هیپراکسی کاهش معنی داری را نشان داد، این یافته در تایید کارهای قبلی انجام شده است (۲۱،۷). علاوه بر این هیپراکسی امتیاز نقص نورولوژیکی در گروه های دریافت کننده CHEL را کاهش داد، این آثار می تواند تا حدی تحمل به ایسکمی را واسطت کند و اهمیت هیپراکسی و PKC در بهبود عملکرد رفتاری را نشان می دهد. بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق به نظر می رسد از یک طرف PKC در بهبود فعالیت های عملکردی رفتاری موثر باشد و از طرف دیگر با مهار آن عملکرد سد خونی - مغزی بهبود می یابد. با در نظر گرفتن این نکته که PKC چندین زیر واحد دارد، احتمال درگیری انواعی از این زیر واحدها در شرایط متفاوت وجود دارد که در کارهای آینده، با استفاده از متدهای مولکولی می توان میزان بیان هر یک از ایزوژیم های PKC، گروه های ذکر شده در آزمایش ما را مورد بررسی قرار داد تا بتوان قضاوت دقیق تری ارائه نمود و سپس با استفاده از آگونیست و یا آنتاگونیست های متناسب، مسیر مورد نظر موثر را

انتخاب نمود. به منظور بررسی مکانیسم دقیق و اینکه چگونه به کارگیری همزمان هیپراکسی و PKC منجر به بهبود عملکرد رفتاری است، مطالعات بیشتری لازم است.

نتیجه گیری:

هیپراکسی در زمان سکتة باعث کاهش میزان نقص نورولوژیک و بهبود عملکرد سد خونی - مغزی می شود. مهار PKC باعث افزایش میزان امتیاز نقص نورولوژیک و بهبود عملکرد سد خونی - مغزی است. هیپراکسی اثر قابل توجهی بر فعالیت PKC در استحکام سد خونی - مغزی نداشته و از مسیری مستقل عمل کرده، اما موجب کاهش امتیاز نقص نورولوژیک در گروه های با مهار PKC می شود. احتمالاً هیپراکسی در استحکام سد خونی - مغزی از طریق مسیرهایی متفاوت از PKC عمل می کند و یا سبب فعال شدن زیر واحدهایی از PKC می شود که مستقل از کلسیم هستند. این آثار تا حدی می تواند تحمل به ایسکمی را واسطت کند. لذا، طراحی موادی که قادر به تقلید آثار انسداد گذرای شریان مرکزی باشند، روش و استراژی جدیدی در پیدایش داروها به وجود خواهد آورد که در به حداقل رساندن آسیب های نورونی طی ایسکمی موثر خواهد بود.

تشکر و قدردانی:

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس تهران انجام شده است. از مشاوره علمی و موثر دکتر مانی و همکاری خانم ها فاطمه محقق و اعظم عسگری نیز تشکر و قدردانی می شود.

منابع:

1. Murray C, Lopez A. Mortality by cause for eight regions of the world Global Burden of Disease Study. Lancet. 1997 May; 349(9061): 1269-76.

2. Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, Niinobe M, et al. Ischemic tolerance phenomenon found in the brain. *Brain Res.* 1990 Sep; 528(1): 21-4.
3. Motabagani M. Histological changes in the alveolar structure of the rat lung after exposure to hyperoxia. *Ital J Anat Embryol.* 2005 Oct-Dec; 110(4): 209-23.
4. Gidday J, Fitzgibbons J, Shah A, Park T. Neuroprotection from ischemic brain injury by hypoxic preconditioning in the neonatal rat. *Neurosci Lett.* 1994 Feb; 168(1-2): 221-4.
5. Kato H, Liu Y, Araki T, Kogure K. but not anisomycin, inhibits the induction of tolerance to ischemia in the gerbil hippocampus. *Neurosci Lett.* 1992; 139: 118-21.
6. Ohtsuki T, Matsumoto M, Kuwabara K, Kitagawa K, Suzuki K, Taniguchi N, et al. Influence of oxidative stress on induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. *Brain Res.* 1992 Dec; 599(2): 246-52.
7. Bigdeli MR, Hajizadeha S, Foroozandeh M, Rasulian B, Heidarianpour A, Khoshbaten A. Prolonged and intermittent normobaric hyperoxia induce different degrees of ischemic tolerance in rat brain tissue. *Brain Res.* 2007 Jun; 1152: 228-33.
8. Prass K, Wiegand F, Schumann P, Ahrens M, Kapinya K, Harms C, et al. Hyperbaric oxygenation induced tolerance against focal cerebral ischemia in mice is strain dependent. *Brain Res.* 2000 Jul; 871(1): 146-50.
9. Ravati A, Ahlemeyer B, Becker A, Klumpp S, Kriegelstein J. Preconditioning-induced neuroprotection is mediated by reactive oxygen species and activation of the transcription factor nuclear factor- κ B. *J Neurochem.* 2001 Aug; 78(4): 909-19.
10. Shin H, Dunn A, Jones P, Boas D, Lo E, Moskowitz M, et al. Normobaric hyperoxia improves cerebral blood flow and oxygenation, and inhibits peri-infarct depolarizations in experimental focal ischaemia. *Brain.* 2007 Jun; 130(Pt 6): 1631-42.
11. Bigdeli MR, Khoshbaten A. In vivo preconditioning with normobaric hyperoxia induces ischemic tolerance partly by triggering tumor necrosis factor- α converting enzyme/tumor necrosis factor- α /nuclear factor. *Neuroscience.* 2008 May; 153(3): 671-8.
12. Warner D, Sheng H, Batinić-Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *Experimental Biology. J Exp Biol.* 2004 Aug; 207(Pt 18): 3221-31.
13. Perez-Pinzon MA, Dave KR, Raval AP. Role of Reactive Oxygen Species and Protein Kinase C in Ischemic Tolerance in the Brain. *Antioxid Redox Signal.* 2005 Sep-Oct; 7(9-10): 1150-7.
14. Thornton J, Striplin S, Liu G, Swafford A, Stanley A, Van Winkle D, et al. Inhibition of protein synthesis does not block myocardial protection afforded by preconditioning. *Am J Physiol.* 1990 Dec; 259(6 Pt 2): H1822-5.
15. Tamatani M, Mitsuda N, Matsuzaki H, Okado H, Miyake S, Vitek M, et al. A pathway of neuronal apoptosis induced by hypoxia/reoxygenation: roles of nuclear factor-kappaB and Bcl-2. *J Neurochem.* 2000 Aug; 75(2): 683-93.
16. Grabb M, Choi D. Ischemic tolerance in murine cortical cell culture: critical role for NMDA receptors. *J Neurosci.* 1999 Mar; 19(5): 1657-62.
17. Chen L, Hahn H, Wu G, Chen C, Liron T, Schechman D, et al. Opposing cardioprotective actions and parallel hypertrophic effects of delta PKC and epsilon PKC. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Sep; 98(20): 11114-9.
18. Harhaj N, Felinski E, Wolpert E, Sundstrom J, Gardner T, Antonetti D. VEGF activation of protein kinase C stimulates occludin phosphorylation and contributes to endothelial permeability. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006 Nov; 47(11): 5106-15.

19. Bigdeli MR, Rasoulia B, Meratan AA. In vivo normobaric hyperoxia preconditioning induces different degrees of antioxidant enzymes activities in rat brain tissue. *Eur J Pharmacol.* 2009 Jun; 611(1-3): 22-9.
20. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 1989 Jan; 20(1): 84-91
21. Mohagheghi F, Bigdeli MR, Rasoulia B, Hashemi P, Rashidi Pour M. The neuroprotective effect of olive leaf extract is related to improved blood-brain barrier permeability and brain edema in rat with experimental focal cerebral ischemia. *Phytomedicine.* 2011; 18(2-3): 170-5.
22. Lakhan SE, Kirchgessner A, Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic Approaches. *J Transl Med.* 2009 Nov; 7: 97
23. Del Zoppo G. Microglial activation and matrix protease generation during focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2007 Feb; 38(2 Suppl): 646-51.
24. Karin E, Sandoval, Ken A. Witt Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol Dis.* 2008 Nov; 32(2):200-19.
25. Yang Y. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007 Apr; 27(4): 697-709.
26. Helms A, Whelan H, Torbey M. Hyperbaric oxygen therapy of cerebral ischemia. *Cerebrovasc Dis.* 2005; 20(6): 417-26.
27. Zhang R, Chopp M, Jiang N, Tang W, Protak J, Manning A, et al. Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the Wistar rat. *Stroke.* 1995; 26: 1438-43.
28. Wada K, Kiyazawa T, Nomura N, Yano A, Tsuzuki N, Nawashiro H, et al. Mn - SOD and Bcl-2 expression after repeated hyperbaric oxygenation. *Acta Neurochir Suppl.* 2000; 76: 285-90.
29. Ostrowski R, Colohan A, Zhang J. Mechanisms of hyperbaric oxygen-induced neuroprotection in a rat model of subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005 May; 25(5): 554-71.
30. Fleegal MA, Hom S, Borg LK, Davis TP. Activation of PKC modulates blood-brain barrier endothelial cell permeability changes induced by hypoxia and posthypoxic reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Nov; 289(5): H2012-9.

Effect of intermittent normobaric hyperoxia and PKC activity on blood - brain barrier (BBB) permeability

Alaviyan F (PhD student)¹, Hajizadeh S (PhD)^{1*}, Bigdely MR (PhD)², Javan M (PhD)¹
¹Psychiatry Dept., Tarbiat Modares University, Tehran, I.R.Iran; ²Biology sciences Dept.,
Shahid Behshti University, Tehran, I.R.Iran.

Received: 6/Nov/2011 Revised: 14/Feb/2012 Accepted: 21/Apr/2012

Background and aims: Studies have recently shown that intermittent normobaric hyperoxia has a significant therapeutic effect on the treatment of acute ischemia, this effect so-called preconditioning. In this study intermittent normobaric effect of hyperoxia and PKC activity in the BBB permeability and behavioral assessment were evaluated.

Methods: In this experimental study 36 wistar rat were divided to 6 groups as follow: normoxi (shem), normoxi+CHEL, normoxi+halt, normoxi+halt+CHEL, hyperoxi+halt, hyperoxi+halt+CHEL, (n=6) in each group. Chelerythrin chlorid (CHEL) was used as a systemically inhibitor of PKC. 24 hours later, rats were subjected to 60 min of right middle cerebral artery occlusion (MCAO). The hyperoxia and normoxia groups were exposed to 95% and 21% respectively, for 4 h/day, 6 continuous days. After 24 h reperfusion, neurological deficit scores and BBB permeability was assessed. Data were analyzed using two way ANOVA and Bonferroni test.

Results: Preconditioning with intermittent normobaric hyperoxia decreased neurologic deficit scores and BBB permeability. Inhibition of PKC resulted in the increase of neurologic deficit scores; which improved with hyperoxia ($P<0.001$). PKC inhibition, independent of hyperoxia improved the BBB function ($P<0.001$).

Conclusion: With the deployment of hyperoxia and specific subunits of PKC during the stroke, stability of BBB integrity and improvement of neurological deficit scores occur.

Keyword: Chelerythrin chloride, Stroke, Preconditioning, PKC, Hyperoxia.

Cite this article as: Alaviyan F, Hajizadeh S, Bigdely MR, Javan M. Effect of intermittent normobaric hyperoxia and PKC activity on blood - brain barrier (BBB) permeability. J Sharekord Univ Med Sci. 2012 July, Aug; 14(3): 40-50.

*Corresponding author:

Medical physiology Dept., Medical faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. Iran,
Tel: 00982182884521, E-mail:hajizads@modares.ac.ir